

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 304 352

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

N° 76 08265

(21)

(54) Undécapeptides cycliques analogues de la somatostatine et leur préparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). A 61 K 37/02; C 07 C 103/52.

(22) Date de dépôt 22 mars 1976, à 15 h 58 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique
le 21 mars 1975, n. 560.671 et le 10 décembre 1975, n. 639.550 au nom de Dimitrios
Sarantakis.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 42 du 15-10-1976.

(71) Déposant : Société dite : AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION, résidant
aux Etats-Unis d'Amérique.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein.

— Mo7K 201:00

La présente invention est relative à des undécapeptides cycliques analogues de la somatostatine et à leur synthèse par une combinaison de la méthode en phase solide et de la méthode classique de synthèse des peptides.

- 5 La somatostatine (connue également sous le nom de facteur inhibiteur de la libération de somatotropine ou SRIF) est le tétradécapeptide :

H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH.

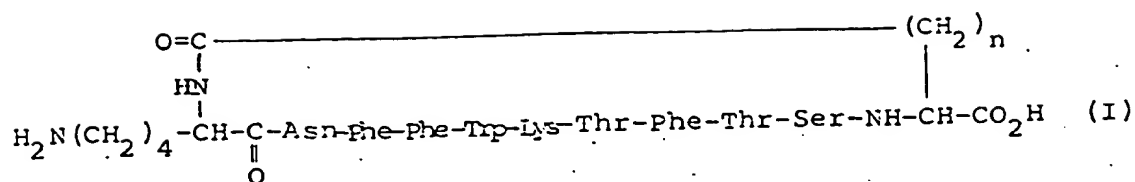
- On a identifié ce tétradécapeptide en l'isolant d'ex-
10 traits de tissus hypothalamiques d'animaux de la race bovine et on a trouvé qu'il inhibe la sécrétion de l'hormone somatotropine que l'on désigne couramment par hormone de croissance (GH) ; voir Brazeau et consort, Science, 179, pages 77-79 (janvier 1973). Brazeau et consort (citation précédente), ont signalé également
15 que la forme linéaire de ce tétradécapeptide :

H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH

- a été synthétisée par une méthodologie en phase solide et qu'elle présente la même activité biologique que la somatostatine obtenue d'une source naturelle. Dans la demande de brevet aux Etats-Unis
20 d'Amérique n° 430.441 du 3 janvier 1974, qui a été délivrée sous le n° 3.882.098, on a décrit l'undécapeptide Des-Ala¹-Gly²-Asn⁵-SRIF et sa forme oxydée, et dans la demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 457.038 du 1 avril 1974, on a décrit le dodécapeptide Des-Ala¹-Gly²-SRIF et sa forme oxydée.

- 25 Des analogues cycliques de somatostatine, ne contenant pas de cystéine, n'ont pas été décrits dans la littérature antérieure. Les undécapeptides cycliques de la présente invention comportent une structure cyclique qui ne contient pas de soufre mais bien du carbone à titre d'élément du noyau et qui en outre
30 ne comporte pas les aminoacides des positions 1 et 2 de la somatostatine (c'est-à-dire Ala et Gly).

Les undécapeptides cycliques de la présente invention, qui empêchent la sécrétion de l'hormone somatotropine, sont représentés par la formule :

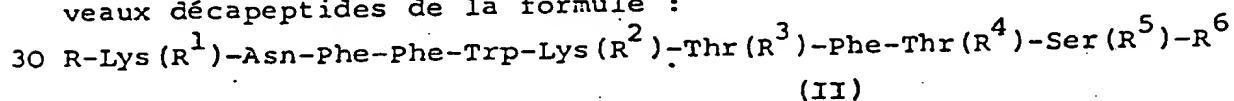


5 dans laquelle Trp représente le D-tryptophyle ou le L-tryptophyle et tous les autres aminoacides sont de la configuration L, l'invention englobant également les sels d'addition d'acide non toxiques des composés précédents. Dans cette formule, n est un nombre entier de 1 à 5 ; lorsque n est égal à 1, l'acide C-terminal est l'acide aspartique ; lorsque n est égal à 2, l'acide C-terminal est l'acide glutamique ; lorsque n est égal à 3, l'acide C-terminal est l'acide α -aminoadipique ; lorsque n est égal à 4, l'acide C-terminal est l'acide α -aminopimélique ; et lorsque n est égal à 5, l'acide C-terminal est l'acide α -aminosubérique. Le composé préféré suivant la formule I susdite est le composé pour lequel n est égal à 2.

Des exemples de sels d'addition d'acide sont le chlorhydrate, le bromhydrate, le sulfate, le phosphate, le maléate, l'acétate, le citrate, le benzoate, le succinate, le malate, l'ascorbate, etc.

La nomenclature utilisée pour définir les peptides suit celle qui a été adoptée par Schroder & Lubke dans "The Peptides", 1, pages VIII-XXIX (Academic Press 1965). Tous les restes d'aminoacides chiraux, identifiés par la formule I et les autres formules présentées par la suite sont de la configuration naturelle ou configuration L, sauf pour le Trp, qui est facultativement de la configuration L ou D.

La présente invention se rapporte également à de nouveaux décapeptides de la formule :



dans laquelle R désigne un groupe protecteur α -amino. Les groupes protecteurs α -amino envisagés pour R sont les groupes connus comme étant d'un intérêt en pratique dans la synthèse graduelle des polypeptides. Parmi les classes de groupes protecteurs α -amino englobés par R, on peut citer : (1) les groupes protecteurs du type acyle illustrés par les groupes suivants : formyle, trifluoroacétyl, phtalyle, toluènesulfonyl (tosyle), benzènesulfo-

nyle, nitrophénylsulfényle, tritylsulfényle, O-nitrophénoxyacétyle, γ -chlorobutyryle, etc. ; (2) les groupes protecteurs du type uréthane aromatiques, illustrés par le benzyloxycarbonyle et les benzyloxycarbonyles substitués, tels que : p-chlorobenzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle, p-bromobenzyloxycarbonyle, p-méthoxybenzyloxycarbonyle, 1-(p-biphénylyl)-1-méthyléthoxycarbonyle, α,α -diméthyl-3,5-diméthoxybenzyloxycarbonyle et benzhydryloxycarbonyle ; (3) les groupes protecteurs du type uréthane aromatiques illustrés par : ter-butyloxycarbonyle, diisopropylméthoxycarbonyle, isopropyloxycarbonyle, éthoxycarbonyle, allyloxycarbonyle ; (4) les groupes protecteurs du type uréthane cycloalcoyliques, illustrés par : cyclopentyloxycarbonyle, adamantyloxycarbonyle, cyclohexyloxycarbonyle ; (5) les groupes protecteurs du type thiouréthane, tels que le phénylthiocarbonyle ; (6) les groupes protecteurs du type alcoyle, tels qu'illustrés par le triphénylméthyle (trityle), le benzyle ; (7) les groupes de trialcoylsilane, tels que le triméthylsilane. Le groupe protecteur α -amino préféré pour R est le ter-butyloxycarbonyle.

Dans la formule précédente, R^1 désigne un groupe protecteur pour le substituant amino de chaîne latérale de la lysine. Des exemples de groupes protecteurs appropriés du substituant amino de chaîne latérale sont le benzyloxycarbonyle et les benzyloxycarbonyles substitués, le substituant étant choisi parmi les radicaux halo (par exemple chloro, bromo, fluoro) et nitro (par exemple 2-chlorobenzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle, 3,4-dichlorobenzyloxycarbonyle), tosyle, t-amyloxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle, diisopropylméthoxycarbonyle, etc. le choix de ce groupe protecteur du substituant amino de chaîne latérale n'est pas critique sauf qu'il doit s'agir d'un groupe qui n'est pas enlevé durant la séparation du groupe protecteur α -amino au cours de la synthèse jusqu'à obtention de l'undécapeptide cyclique répondant à la séquence désirée d'acides aminés. De ce fait, le groupe protecteur α -amino et le groupe protecteur R^1 du substituant amino de la chaîne latérale de la lysine, désigné par R^1 , ne peuvent pas être identiques.

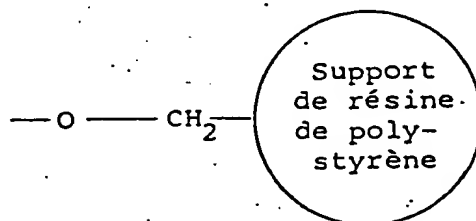
Dans la formule précédente, R^2 est choisi parmi les groupes protecteurs de lysine, définis par R^1 .

R^3 , R^4 et R^5 sont des groupes protecteurs pour le grou-

pe hydroxyle alcoolique de la thréonine et de la sérine et ils sont choisis parmi l'acétyle, le benzoyle, le butyle tertiaire, le trityle, le benzyle, le dichloro-2,6 benzyle et le benzyloxy-carbonyle. Le groupe protecteur préféré dans ce cas est le benzyle ; R^3 et/ou R^4 et/ou R^5 peuvent aussi représenter de l'hydrogène, ce qui signifie alors qu'il n'y a pas de groupe protecteur sur la fonction hydroxyle alcoolique.

R^6 est choisi parmi OH, $NHNH_2$, N_3 , OCH_3 et

10

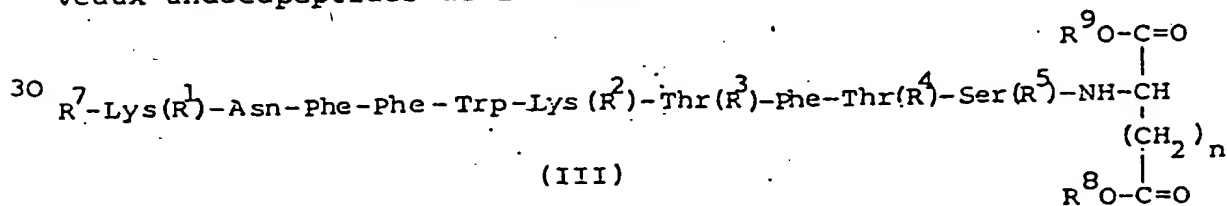


15

Le support de résine de polystyrène est de préférence constitué par un polymère de styrène avec environ 1 à 2 % de divinylbenzène à titre d'agent de réticulation, ce qui amène le polymère de polystyrène à être totalement insoluble dans certains solvants organiques. Le polymère de polystyrène est composé de longues chaînes d'alcoyles, portant un noyau de phényle sur un carbone sur deux et le reste d'acide terminal (Ser) est réuni par une liaison carbone-carbone covalente à ces noyaux de phényle. Les chaînes d'alcoyles sont réticulées à peu près sur chaque cin-

20 quantième atome de carbone par des restes de p-diéthylphényle, dérivant du divinylbenzène.

La présente invention se rapporte également à de nouveaux undécapeptides de la formule :



dans laquelle R^7 est choisi parmi l'hydrogène et les groupes protecteurs α -amino définis par R ; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 et R^5 ont la même signification que dans le cas de la formule II ; R^8 désigne l'hydrogène ou un groupe protecteur carboxyle de chaîne latérale, qui est enlevé sous des conditions qui ne sépareront pas le groupe

30

protecteur α -carboxyle R^9 . De ce fait, R^8 et R^9 ne peuvent pas représenter un même groupe protecteur. Des exemples de groupes protecteurs carboxyles de chaîne latérale, représentant R^8 , sont le butyle tertiaire, le benzhydryle et le méthyle ; R^9 est un

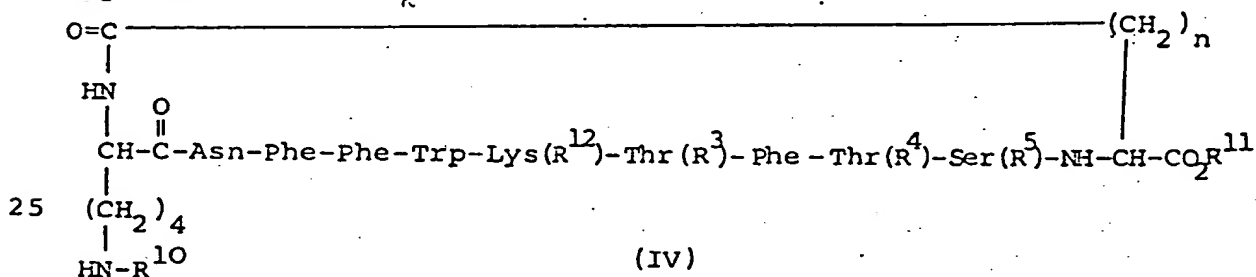
5 groupe protecteur α -carboxyle. Le groupe protecteur α -carboxyle représenté par R^9 est un groupe qui est stable sous les conditions qui (1) séparent le groupe protecteur carboxyle R^8 , s'il y en a un, et (2) séparent tout groupe protecteur α -amino se trouvant sur le groupe lysyle de la partie N-terminale du peptide. Le

10 groupe protecteur carboxyle R^9 est illustré par les alcoyles C_1-C_6 (par exemple méthyle, éthyle, butyle, pentyle, isobutyle), le benzyle, les benzyles substitués (comportant au moins un substituant des groupes nitro, méthoxy et méthyle, de sorte qu'il s'agit par exemple du p-méthoxybenzyle, du 2,4-diméthoxybenzyle,

15 du p-nitrobenzyle, du 2,4,6-triméthylbenzyle), le phénacyle, le phthalimidométhyle, le benzhydryle, le trichloroéthyle, le 4-picolyle, le β -méthylthioéthyle et le 4-(méthylthio)phényle. Le groupe R^9 préféré est le benzyle.

La présente invention englobe également des composés

20 répondant à la formule :



dans laquelle R^3 , R^4 et R^5 ont la signification donnée pour la formule II ; R^{10} est choisi parmi l'hydrogène et les groupes désignés par R^1 ; R^{11} est choisi parmi l'hydrogène et les groupes désignés par R^9 ; et R^{12} est choisi parmi l'hydrogène et les groupes désignés par R^2 , à la condition qu'au moins l'un des R^3 , R^4 , R^5 , R^{10} , R^{11} et R^{12} soit différent de l'hydrogène.

30

On prépare les nouveaux décapeptides de la formule II

35 en utilisant une synthèse en phase solide. On commence la synthèse à partir de l'extrémité C-terminale du peptide en utilisant une résine protégée par α -amino. On peut préparer une telle matière de départ en attachant une sérine protégée par α -amino à

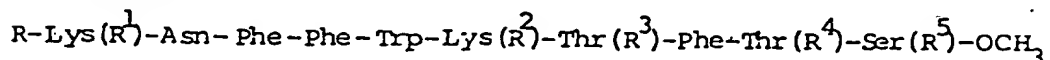
une résine chlorométhylée ou une résine hydroxyméthylée. La préparation de la résine hydroxyméthylée a été décrite par Bodanszky et consort, Chem. Ind. (Londres) 33, 1597-98 (1966). Une résine chlorométhylée est disponible sur le marché en provenance de la société Bio Rad Laboratories, Richmond, Californie, et la préparation d'une telle résine a été décrite par Stewart et consort, "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco, 1969), Chapitre 1, pages 1-6. La sérine protégée par α -amino et en chaîne latérale est combinée avec la résine chlorométhylée suivant la procédé de Gisin, Helv. 56, pages 1476 (1973). Après la combinaison de cette sérine avec le support de résine, on enlève le groupe protecteur α -amino, par exemple en utilisant de l'acide trifluoroacétique dans du chlorure de méthylène, de l'acide trifluoroacétique seul ou du HCl dans du dioxane. La suppression de la protection est réalisée à une température comprise entre environ 0°C et la température ambiante. D'autres réactifs et conditions classiques de séparation, permettant l'enlèvement de groupes protecteurs α -amino particuliers, peuvent s'utiliser, comme décrit notamment par Schroder & Lubke, citation précédente, 1, pages 72-75. Après séparation du groupe protecteur α -amino, les aminoacides protégés par α -amino restants sont combinés de manière graduelle dans l'ordre désiré en vue d'obtenir un composé de la formule (II) ou bien à titre de variante de l'addition séparée de chaque aminoacide au cours de la synthèse, certains de ces aminoacides peuvent être combinés avant l'addition à la réaction en phase solide. Le choix d'un réactif approprié de combinaison est du domaine de l'expérience courante. Un réactif de combinaison particulièrement approprié est le N,N¹-diisopropyl carbodiimide. Comme mentionné précédemment, les réactifs activants utilisés dans la synthèse décrite ci-dessus sont les réactifs bien connus dans la technique des peptides. Des exemples de ces réactifs sont : (1) les carbodiimides (par exemple N,N¹-dicyclohexylcarbodiimide, N-éthyl N¹-(γ -diméthylamino propyl carbodiimide) ; (2) les cyanamides (par exemple N,N-dibenzylcyanamide) ; (3) les céténimines ; (4) les sels d'isoxazolium (par exemple N-éthyl-5-phényl isoxazolium-3¹-sulfonate ; (5) les amides hétérocycliques contenant de l'azote monocyclique, de type aromatique, contenant 1 à 4 atomes d'azote dans le noyau, par exemple les imidazo-

lides, les pyrazolides, les 1,2,4-triazolides. Des amides hétérocycliques intéressants sont : N,N^1 -carbonyldiimidazole, N,N^1 -carbonyl-di-1,2,4-triazole ; (6) les acétylènes alcoxylés (par exemple éthoxyacétylène) ; (7) les réactifs qui forment un anhydride mixte avec le fragment de carboxyle de l'acide aminé (par exemple le chloroformiate d'éthyle, le chloroformiate d'isobutyle) ; et (8) les composés hétérocycliques contenant de l'azote, comportant un groupe hydroxy sur un azote du noyau (par exemple N-hydroxyphthalimide, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxybenzotriazole).

10 D'autres réactifs activants et leur utilisation dans la combinaison des peptides sont décrits par Schroder & Lubke, supra, Chapitre III et par Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, pages 1-27, (1970).

Chaque acide aminé protégé ou séquence d'acides aminés est introduit dans la réaction en phase solide en un excès d'environ 15 4 fois et on réalise la combinaison dans un milieu de diméthylformamide/chlorure de méthylène (1/1) ou dans du diméthylformamide seul ou du chlorure de méthylène seul. Dans les cas où une combinaison incomplète se développe, le procédé de combinaison est répété avant enlèvement du groupe protecteur α -amino, et ce 20 avant la combinaison de l'acide aminé suivant à la réaction en phase solide. Le succès de la réaction de combinaison, à chaque stade de la synthèse, est surveillé par la réaction à la ninhydrine, comme décrit par E. Kaiser et consort, *Analyt. Biochem.*, 34, 595 (1970).

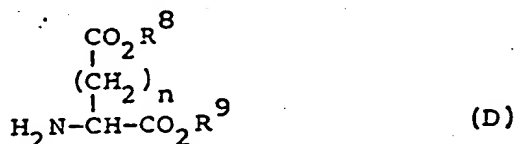
25 : Après obtention de la séquence désirée d'acides aminés de la formule II, on sépare le peptide de la résine. Ceci peut se réaliser par méthanolyse pour obtenir un composé répondant à la formule :



30 puis l'ester méthylique C-terminal est converti en l'acide correspondant par hydrolyse, cette opération étant suivie par l'activation du groupe carboxyle et la formation de l'hydrazide par des méthodes classiques de la synthèse des peptides en vue d'obtenir un composé de la formule III. Toutefois, le procédé préféré 35 ré pour l'obtention d'un composé de la formule I est un procédé se développant suivant le schéma de réactions donné à la fin de la présente description. En considérant ce schéma, un décapeptide lié à une résine de la formule $R-Lys(R^1)-Asn-Phe-Phe-Trp-$

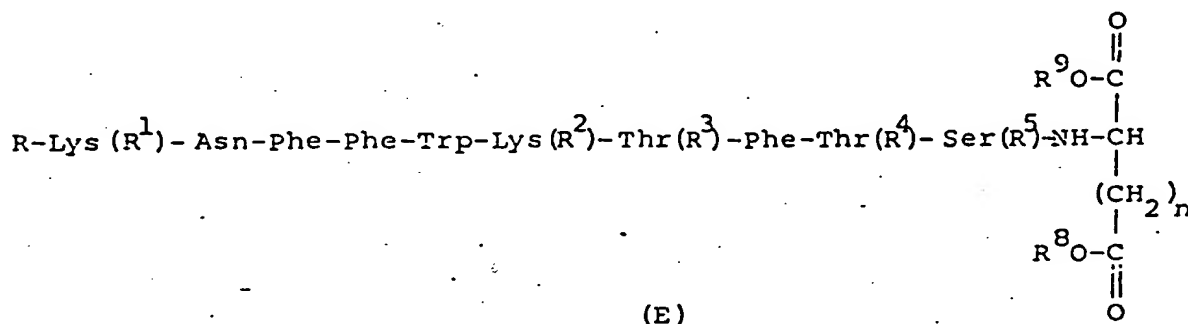
Lys(R²)-Thr(R³)-Phe-Thr(R⁴)-Ser(R⁵)-O-CH₂-support de résine de polystyrène (A) est converti en l'hydrazide correspondant de la formule R-Lys(R¹)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(R²)-Thr(R³)-Phe-Thr(R⁴)-Ser(R⁵)-NHNH₂ (B) par réaction avec de l'hydrazine. On convertit alors l'hydrazide de formule B en l'azide correspondant de la formule R-Lys(R¹)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(R²)-Thr(R³)-Phe-Thr(R⁴)-Ser(R⁵)-N₃ (C) par réaction avec un réactif qui fournit de l'acide nitreux in situ. Des réactifs appropriés à cet effet sont les nitrites d'alcoyles inférieurs (par exemple le nitrite de t-butyle, le nitrite d'isoamyle) ou un nitrite de métal alcalin (par exemple du nitrite de sodium, du nitrite de potassium) en présence d'un acide fort, tel que de l'acide chlorhydrique, de l'acide phosphorique, de l'acide sulfonique, etc. Cette réaction est réalisée en présence d'eau et/ou d'un solvant non aqueux, tel que du diméthylformamide, du tétrahydrofurane, du dioxane, du chloroforme, du chlorure de méthylène, etc., à une température comprise entre environ -40°C et +20°C. L'azide de la formule C, qui n'est de préférence pas isolé du milieu de réaction, est alors combiné avec un aminoacide de la formule :

20



dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 5, pour obtenir un undécapeptide de la formule :

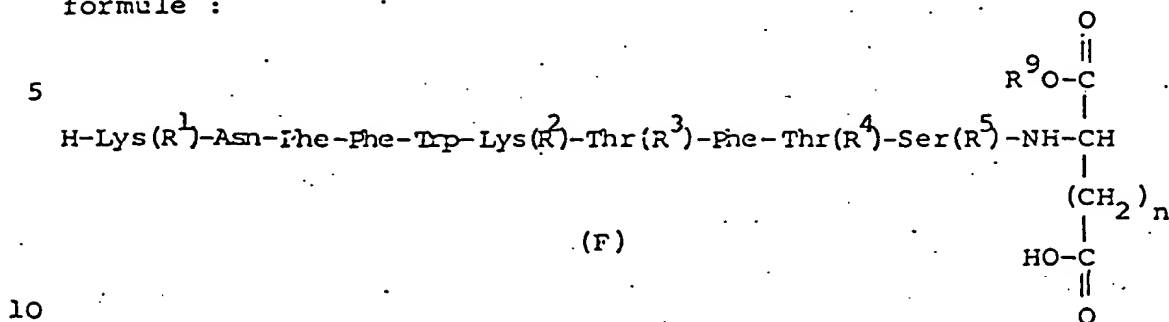
30



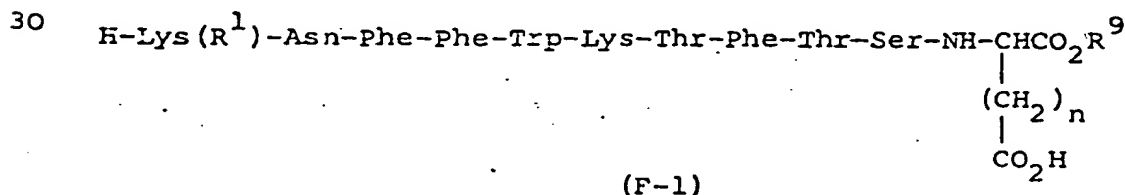
Cette combinaison est réalisée à une température comprise entre environ -50°C et +50°C, de préférence entre environ -25°C et +10°C.

On fait ensuite réagir l'undécapeptide de formule (E) avec un réactif de séparation qui libérera le groupe protecteur

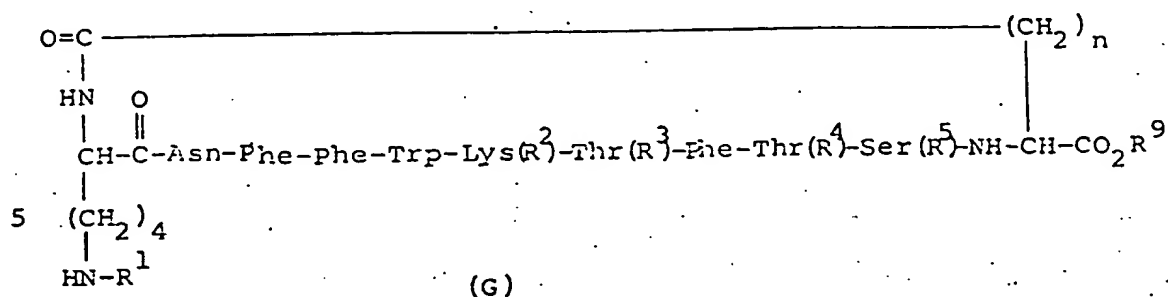
α -amino se trouvant sur la lysine, ainsi que le groupe protecteur carboxyle R^8 , s'il y en a un, et ce pour donner un composé de la formule :



Il est essentiel que le réactif de séparation soit un réactif ne libérant pas, à ce stade de la synthèse, les groupes protecteurs α -amino de chaîne latérale R^1 et R^2 , se trouvant sur les restes de l'acide aminé lysine dans les positions 1 et 6 de l'undécapeptide, ni le groupe protecteur α -carboxyle représenté par R^9 . Si ces groupes protecteurs étaient séparés à ce stade, la cyclisation désirée de la phase suivante du procédé ne se développerait pas. Un réactif de séparation particulièrement approprié est l'acide trifluoroacétique, lorsque R représente le t-butyloxycarbonyle, R^8 représente le butyle tertiaire, R^1 représente le 2-chlorobenzoyloxycarbonyle et R^9 représente le benzyle. Le choix d'un réactif compatible pour la séparation des divers groupes protecteurs bien connus α -amino et en chaîne latérale est décrit par Schroder & Lubke, supra, 1, pages 72-75. Bien qu'il soit préférable que les groupes protecteurs quelconques en chaîne latérale, représentés par R^2 , R^3 , R^4 et R^5 , ne soient pas séparés durant la formation d'un composé de la formule F, de tels groupes peuvent toutefois être séparés, si on le désire, pour obtenir un composé de la formule :



35 Le composé de formule F est alors cyclisé pour produire un composé de la formule :

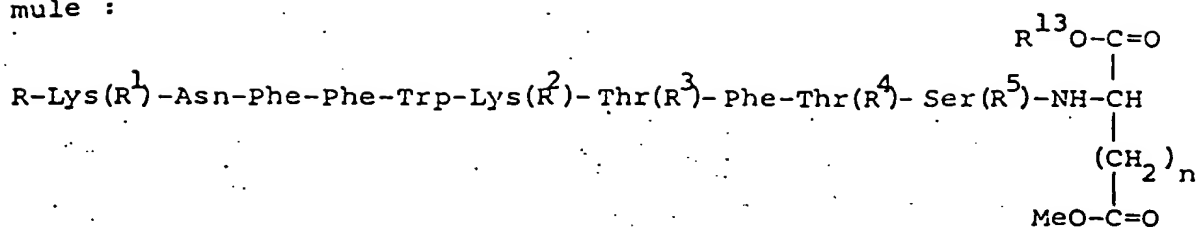


Cette cyclisation est de préférence réalisée en utilisant du N,N¹-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du N-hydroxybenzo-
 10 triazole en présence d'un solvant organique, dans un intervalle de températures de -40°C à +20°C. Des solvants appropriés sont le diméthylformamide, le dichlorométhane, le chloroforme, le dioxane, le tétrahydrofur et leurs mélanges. On peut également utiliser d'autres réactifs de cyclisation, exemplifiés no-
 15 tamment par les réactifs de combinaison décrits ci-dessus en liaison avec la préparation du décapeptide-résine, ainsi que ceux décrits par Kopple, J. Pharm. Science, 61; pages 1345-1356 (1972).

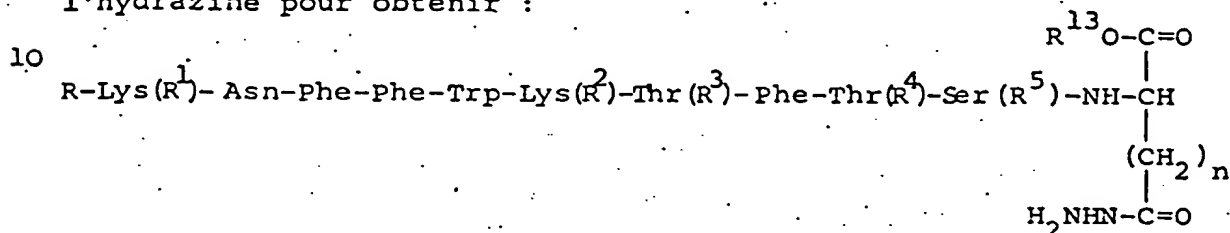
On convertit alors un composé de formule IV en un com-
 20 posé de formule I, par séparation du groupe protecteur amino de chaîne latérale R¹, ainsi que du groupe protecteur α-carboxyle R⁹, en même temps que les groupes protecteurs quelconques représentés par R², R³, R⁴ et R⁵. Un système particulièrement approprié de séparation est constitué par de l'hydrogène sur un catalyseur de
 25 palladium. La phase de séparation, si on le désire, peut être réalisée de manière graduelle par le choix d'un réactif qui ne séparera que le groupe protecteur α-carboxyle R⁹, avec ensuite utilisation d'un réactif qui séparera le groupe protecteur R¹ et les autres groupes protecteurs de chaîne latérale quelconques. A
 30 titre de variante, les groupes R¹ peuvent être séparés d'abord, avec ensuite séparation simultanée ou de manière séquentielle des autres groupes protecteurs, notamment du groupe R⁹. Le choix de réactifs appropriés de séparation, que l'on peut utiliser et qui sont compatibles avec le groupe particulier α-carboxyle et de
 35 chaîne latérale, a été décrit par Schroeder & Lubke, supra, pages 72-75.

Une autre méthode de préparation des composés de la formule (IV) consiste à convertir un composé répondant à la for-

mule :



dans laquelle R^{13} est choisi parmi l'hydrogène et R^9 , et Me désigne le méthyle, en l'hydrazide correspondant par réaction avec de l'hydrazine pour obtenir :



avec ensuite conversion de ce composé en l'azide correspondant par réaction avec un réactif qui donnera de l'acide nitreux in situ, de la manière décrite précédemment. On cyclise alors l'azide après séparation préalable du groupe protecteur α -amino se trouvant sur la lysine.

Les matières représentées par la formule D sont des matières connues de la technique antérieure et/ou on peut les préparer aisément par des techniques traditionnelles pour des aminoacides non protégés bien connus, notamment l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide α -aminoadipique, l'acide α -aminopimérique et l'acide α -aminosubérique. La préparation de ces aminoacides a été décrite par Farkasova et consort, Col. Czechoslov. Chem. Commun. 30, 3117 (1965). La préparation d'esters protégés par ω -carboxyle a été décrite par Schroder et consort, Annalen 673, pages 196, 208 (1964) et Rudinger et consort, Col. Czechoslov. Chem. Commun. 32, 1229 (1967).

Les Exemples suivants illustreront encore plus complètement la préparation des composés de la présente invention.

Exemple 1

α -N-t-Butyloxycarbonyl- ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyll-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-L-tryphtophyl- ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-O-benzyl-L-thréoninyl-O-benzyl-L-séryl-hydroxyméthyl-résine de polystyrène

On estérifie 10 g de résine de polystyrène chlorométhylée (Lab Systems, Inc.) avec le sel de césium de Boc-Ser(Bzl)-OH (7,5 mmoles) comme décrit par Gisin, Helv. 56, 1476 (1973). On analyse l'acide-amino-résine par une analyse quantitative des acides-amino et on a trouvé qu'il y a 0,40 mmole de sérine par gramme. On traite cet ester polymère suivant le plan A pour l'incorporation de Boc-Thr(Bzl)OH, Boc-Phe-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Lys(Clz)-OH, Boc-Trp-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Phe-OH. Le reste d'asparagine est introduit sous la forme d'ester p-nitrophénylique activé, Boc-Asn-ONP, suivant le plan B et finalement le Boc-Lys(Clz)-OH suivant le plan A.

Plan A

1. On traite de la façon suivante l'ester polymère Boc-Ser(Bzl)-O-résine, à raison de 10 g équivalents à 4 mmoles de sérine/g :
- 15 2. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
3. On traite avec de l'acide trifluoroacétique- CH_2Cl_2 -dithioérythrite (1:1:0,5%) pendant 5 minutes
4. On traite avec de l'acide trifluoroacétique- CH_2Cl_2 -dithioérythrite (1:1:0,5%) pendant 25 minutes
- 20 5. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
6. On lave avec du diméthylformamide
7. On traite avec de la triéthylamine à 12% dans du diméthylformamide deux fois pendant 3 minutes.
8. On lave avec du diméthylformamide
- 25 9. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
10. On traite avec 20 mmoles du dérivé correspondant d'acide-amino dissous dans du CH_2Cl_2 -diméthylformamide et on agite pendant 5 minutes
11. On ajoute en deux portions 25 mmoles de diisopropylcarbodiimide sur une période de 30 minutes, la durée de réaction étant de 18 heures
12. On lave avec du diméthylformamide
13. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
14. On procède à l'essai à la ninhydrine suivant Kaiser et consort, Anal. Biochem., 34 595 (1970). Dans le cas d'une réaction incomplète, on répète les phases 10 à 14 susdites.
- 35

Plan B

1. On traite de la façon suivante la peptido-résine (dans le présent exemple, Boc-Phe-Phe-Trp-Lys(Clz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-O-résine :
- 5 2. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
3. On traite avec de l'acide trifluoroacétique- CH_2Cl_2 -dithioérythrite (1:1:0,5%) pendant 5 minutes
4. On traite avec de l'acide trifluoroacétique- CH_2Cl_2 -dithioérythrite (1:1:0,5%) pendant 25 minutes
- 10 5. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
6. On lave avec du diméthylformamide
7. On traite avec de la triéthylamine à 12% dans du diméthylformamide, et ce deux fois pendant 3 minutes
8. On lave avec du diméthylformamide
- 15 9. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
10. On traite avec 40 mmoles de Boc-Asn-ONP en présence de 2-3 gouttes d'acide acétique glacial et en dissolution dans du diméthylformamide, la durée de réaction étant de 72 heures
11. On lave trois fois avec du diméthylformamide
- 20 12. On lave trois fois avec du CH_2Cl_2
13. On procède à la réaction à la ninhydrine

La peptido-résine citée en rubrique, Boc-Lys(Clz)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Clz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-O-résine, est hydrolysée et analysée.

- 25 On prépare l'analogue D-Trp⁵ par le même procédé, sauf que l'on substitue le Boc-D-tryptophane au Boc-L-tryptophane.

Exemple 2

- α -Butyloxycarbonyl- ϵ -2-chlorobenzvloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-L-tryptophyl- ϵ -2-chlorobenzyl-
- 30 oxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-O-benzyl-L-thréoninyl-O-benzyl-L-séryl-hydrazide

- La peptido-résine Boc-Lys(ClCbz)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(ClCbz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-O-résine (10 g) de l'Exemple 1 est mélangée avec 75 ml de diméthylformamide et ensuite avec 10 ml
- 35 d'hydrazine (qualité de 95% et plus), et on agite le mélange pendant la nuit.

On filtre le mélange, on lave la partie solide avec une quantité supplémentaire de diméthylformamide et on évapore

les filtrats combinés jusqu'à un petit volume. On traite le reste avec un excès d'eau pour donner un solide que l'on dissout dans une certaine quantité de diméthylformamide, puis on précipite à nouveau avec de l'eau, la production étant de 2,8 g.

5 Analyse des aminoacides : Asp (1) 0,84 ; Thr (2) 1,62 ; Ser (1) 0,56 ; Phe (3) 3 ; Lys (2) 2,02 ; NH_3 , Trp, non déterminés.

On prépare l'analogue D-Trp⁵ par le même procédé.

Exemple 3

10 α -Butyloxycarbonyl- ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-L-tryptophyl- ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-O-benzyl-L-thréoninyl-O-benzyl-L-séryl- α -benzyl-L-t-butyl-L-glutamate

L'hydrate, Boc-Lys(ClCbz)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(ClCbz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)- NH_2 (1,95 g ; 1 mmole) de 15 l'Exemple 2 est dissous dans du diméthylformamide (environ 50 ml) refroidi à -20°C , et on traite avec du HCl/EtOAc (4,7 N ; 0,6 ml), puis avec du nitrite d'isoamyle (0,2 ml). On agite la solution pendant 10 minutes à -20°C , puis on la rend alcaline avec du NEt_3 (0,6 ml). A cette solution, on ajoute du H-Glu(O-tert-Bu)-OBzl 20 (0,3 g) et on agite à -20°C pendant 1 heure, puis à 0°C pendant 4 jours. On évapore le mélange jusqu'à siccité sous vide et on triture le reste avec un excès d'eau pour obtenir un solide blanc qu'on lave sur le filtre avec 10% d'acide citrique et de l'eau. La production est de 1,9 g.

25 Analyse des aminoacides : Asp (1) 1,01 ; Thr (2) 1,73 ; Ser (1) 0,68 ; Glu (1) 0,84 ; Phe (3) 3 ; Lys (2) 2,1 ; NH_3 , Trp, non déterminés.

L'analogue correspondant contenant du D-Trp⁵ est combiné avec du H-Glu(O-tert-Bu)-O-Bzl par le même procédé.

30 Analyse des aminoacides : Asp (1) 1,14 ; Thr (2) 2,10 ; Ser (1) 0,71 ; Glu (1) 1,26 ; Phe (3) 3 ; Lys (2) 1,74 ; NH_3 (1) 2,72 ; Trp, non déterminé.

Exemple 4

35 ϵ -2-Chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-L-tryptophyl- ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-O-benzyl-L-thréoninyl-O-benzyl-L-séryl- α -benzyl-L-glutamate

L'undécapeptide protégé, Boc-Lys(ClCbz)-Asn-Phe-Phe-

Trp-Lys(ClCbz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(O-t-Bu)-OBzl (1,8 g) de l'Exemple 3 est mélangé avec 3 ml d'anisole et on traite avec 50 ml de TFA pendant 30 minutes à la température ambiante. On évapore la solution jusqu'à siccité sous vide et on balaye deux fois le reste avec de l'éther. On triture le reste avec de l'éther et on dissout la matière solide dans une certaine quantité de diméthylformamide. On verse cette solution dans 100 ml d'une solution de NH_4OAc dans de l'eau, ajustée au pH de 6,5. On récolte la matière solide blanche qui précipite et on sèche pour obtenir 1,35 g de la matière identifiée précédemment.

Analyse des aminoacides : Asp (1) 1,02 ; Thr (2) 1,64 ; Ser (1) 0,66 ; Glu (1) 0,80 ; Phe (3) 3 ; Lys (2) 1,99 ; NH_3 (1) 1,74 ; Trp, non déterminé. (TFA = acide trifluoroacétique)

On supprime partiellement la protection de l'analogue 15 D-Trp⁵ de la même manière.

Exemple 5

L-lysyl-L-asparaginyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-L-thréoninyl-L-séryl-L-glutamyl (cyclo α -lysyl à γ -glutamyl) peptide

20 L'undécapeptide, H-Lys(ClCbz)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys (ClCbz)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OH)OBzl (1,1 g) de l'Exemple 4 est dissous dans 250 ml de diméthylformamide et 100 ml de CH_2Cl_2 , mélangé à du N-hydroxybenzotriazole (1,3 g) refroidi dans un bain de glace et traité avec du DCC (0,5 g) pendant 25 heures à froid, puis pendant 30 heures à la température ambiante.

On évapore le mélange jusqu'à siccité, on triture le reste avec de l'eau pour obtenir un précipité qu'on lave avec du KHCO_3 aqueux, de l'eau, une solution aqueuse à 10% d'acide citrique, et de l'eau, puis on dessèche. On fait digérer le solide sec 30 avec du EtOH absolu au bain-marie qu'on laisse revenir à la température ambiante, puis on filtre. La matière se trouvant sur le filtre (570 mg) est mise en suspension dans du $\text{AcOH-H}_2\text{O}$ (100 ml, 1/1) en mélange avec 10% de Pd-C (100 mg), et on procède à hydrogénation pendant 20 heures. On sépare le catalyseur et on 35 évapore le filtrat jusqu'à siccité, puis on le reprend dans du AcOH aqueux dilué et on lyophilise pour obtenir 82 mg d'une poudre qui est le produit identifié ci-dessus.

R_f (n-butanol-eau-acide acétique glacial, 4:5:1) : 0,60

R_f (n-butanol-eau-acide acétique glacial-pyridine, 30:24:6:20):
0,70

Analyse des aminoacides : Asp (1) 0,97 ; Thr (2) 1,84 ; Ser (1) 0,73 ; Glu (1) 0,89 ; Phe (3) 3 ; Lys (2) 1,91 ; NH_3 , Trp, non
5 déterminés.

Exemple 6

L-Lysyl-L-asparaginyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-D-tryptophyl-
L-lysyl-L-thréoninyl-L-phénylalaninyl-L-thréoninyl-L-séryl-glutamyl-
(cyclo- α -lysyl à γ -glutamyl)peptide

10 On dissout l'undécapeptide partiellement débarrassé de la protection, issu du dernier paragraphe de l'Exemple 4 (3 g), dans du DMF (36 ml) et du CH_2Cl_2 (322 ml), puis on ajoute de la triéthylamine (0,2 ml) pour amener le pH à 7. On ajoute du N-hydroxybenzotriazole (1 g) et on refroidit le mélange au bain de
15 glace, puis on traite avec du DCC (0,59 g) pendant 2 jours et sous agitation. On filtre le mélange de réaction et on évapore le filtrat jusqu'à un petit volume. On ajoute un excès d'eau pour obtenir une matière solide blanche que l'on filtre, lave à l'eau et sèche sur du P_2O_5 . La production est de 2,5 g.

20 L'undécapeptide cyclique (2 g), partiellement débarrassé de sa protection, a ensuite été traité avec de l'acide fluorhydrique liquide (environ 100 ml) en présence d'anisole (5 ml) et à l'exclusion d'air pendant 35 minutes dans un bain de glace. On
25 sépare l'excès de HF sous vide aussi vite que possible, on reprend le reste dans du AcOH aqueux 2M et on extrait la phase aqueuse avec de l'éther diéthylique pour séparer l'anisole. La solution aqueuse est lyophilisée pour donner 1,03 g de matière solide. Cette matière brute (1 g) est appliquée à une colonne de Sephadex G-25 (2,5 x 120 cm) et on procède à une élution avec
30 du AcOH aqueux 2M. Les fractions (4 ml chacune) qui émergent dans les tubes 89-109 sont rassemblées et lyophilisées pour donner 155,8 mg d'un solide évanescent. On applique ce solide à une colonne de Sephadex G-10 (1,5 x 50 cm) et on procède à élution. Les éluats des tubes 13-35 sont rassemblés et lyophilisés pour
35 donner le composé cité en rubrique, 111,9 mg, $[\alpha]_D^{26} = -30$ (0,5, AcOH 75%).

Chromatographie en couche mince, plaques de Avicel (n-butanol-eau-acide acétique, 4/1/1) 0,47 ; (n-butanol-eau-acide acétique-pyridine, 30/24/6/20), 0,71. (DMF = Diméthylformamide)

Analyse des aminoacides : Asp (1) 1,02 ; Thr (2) 1,96 ; Ser (1) 0,92 ; Glu (1) 0,99 ; Phe (3) 3,12 ; Lys (2) 2 ; NH_3 (1) 1,16 ; Trp (1) 0,77.

On a déterminé les activités d'hormone de croissance des composés de l'Exemple 5, en injectant à des rats pesant environ 200-250 g, d'abord du nembutal dans le péritoine à une dose de 50 mg/kg, puis 5 minutes après, par voie sous-cutanée, une solution du composé de l'Exemple 5 en solution saline à une dose de 2 mg/kg par rat. Des échantillons de sang sont prélevés 15 minutes après injection du composé de l'Exemple 5, et le taux d'hormone de croissance est déterminé par une radio-détermination d'immunité. Le taux moyen d'hormone de croissance chez les rats témoins (13 animaux) était, d'après ce que l'on a trouvé, de 132 ± 20 ng/ml, tandis que le taux d'hormone de croissance chez les rats (13 animaux) ayant reçu le composé de l'Exemple 5 était de 79 ± 14 ng/ml. L'expérience précédente a été répétée mais la dose du composé de l'Exemple 5 a été élevée à 2,38 mg/kg et le prélèvement d'échantillons de sang a été fait 2 heures après l'injection. Le taux moyen d'hormone de croissance chez les rats témoins (15 animaux) était de 244 ± 38 ng/ml, tandis que le taux d'hormone de croissance chez les rats (15 animaux) ayant reçu le composé de l'Exemple 5 était de 89 ± 23 ng/ml.

En suivant le même procédé, on a déterminé l'activité du produit de l'Exemple 6 deux heures après administration de 1500 $\mu\text{g/kg}$ et on a trouvé un taux d'hormone de croissance de 18 ± 4 ng par ml, tandis que le taux d'un groupe témoin était de 180 ± 27 ng/ml ; après 4 heures, on trouvait un taux de 34 ± 11 ng/ml, tandis que le taux du groupe témoin se situait à 182 ± 49 ng/ml.

La découverte d'une réduction importante du taux d'hormone de croissance après 2 heures démontre que les composés de la formule I présentent, de façon surprenante, une activité prolongée sensiblement plus longue que celle de la somatostatine qui, d'après Brazeau et consort, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 60, page 1202 (1974), a une demi-vie biologique d'environ 4 minutes.

On a procédé à une autre essai sur le composé de l'Exemple 5 pour déterminer son effet sur les taux d'insuline et de glucagon. La détermination in vivo donnant la libération si-

multanée de l'hormone de croissance, de l'insuline et du glucagon a été faite en injectant à trois groupes de rats mâles pesant environ 200 à 250 g (9 animaux par groupe) du pentobarbital dans le péritoine à une dose de 50 mg/kg par rat, et en prévoyant ensuite, 5 15 minutes plus tard, une injection sous-cutanée du composé de l'Exemple 5 à une dose de 2,7 mg/kg à un groupe de rats, une injection sous-cutanée de SRIF à une dose de 0,2 mg/kg à un autre groupe de rats et une injection sous-cutanée d'une solution saline au troisième groupe de rats. Dix minutes après une telle in- 10 jection, les rats ont reçu, directement dans le coeur, 150 mg d'arginine dans 0,5 ml de solution saline. Cinq minutes plus tard, les rats ont été décapités, on a récolté le sang et on a procédé à diverses radio-déterminations d'immunité. Les résultats ont indiqué que ni le taux de glucagon, ni le taux d'insu- 15 line n'ont été abaissés par l'administration du composé de l'Exemple 5, tandis que les taux de ces deux hormones ont été abaissés par la somatostatine.

D'une manière analogue, on a essayé le produit de l'Exemple 6 au cours de trois expériences distinctes, et on a ob- 20 tenu les résultats suivants :

<u>Composé</u>	<u>Dosé µg/kg</u>	<u>GH ng/ml</u>	<u>Insuline µU/ml</u>	<u>Glucagon picoq/ml</u>
1. témoin		247±52	194±17	nd
Exemple 6	3.000	61±7	152±13	nd
25 2. témoin		315±22	nd	nd
Exemple 6	12	192±29	nd	nd
3. témoin		nd	183±19	129±9
Exemple 6	3.000	nd	93±9	107±9

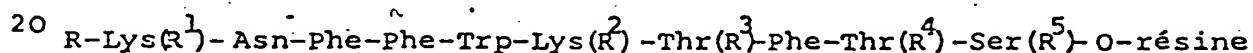
nd : non déterminé

30 On peut administrer le composé de la formule I aux mam-
mifères à sang chaud, notamment aux êtres humains, par voie in-
traveineuse, sous-cutanée, intramusculaire ou orale pour empêcher
la libération de l'hormone de croissance lorsque le sujet traité
exige un traitement thérapeutique en raison d'un excès de sécré-
35 tion de somatotropine, qui est associé à des états, tels que
l'acromégalie. La posologie envisagée pour l'administration par
voie orale, sous forme de comprimés ou de capsules, à de grands

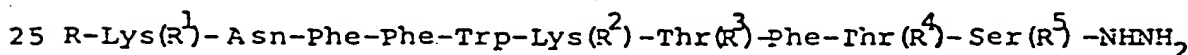
mammifères, est d'environ 0,015 mg à environ 7 mg/kg de poids de corps par jour, tandis que la posologie pour une injection intraveineuse en solution aqueuse est d'environ 0,14 µg à environ 0,15 mg/kg de poids de corps par jour. Lors d'une administration sous-cutanée ou intramusculaire, on envisage une posologie d'environ 1,5 µg à environ 7 mg/kg de poids de corps par jour. Evidemment, la dose requise variera avec l'état particulier que l'on traite, la rigueur de cet état et la durée du traitement.

Si on administre l'ingrédient actif sous la forme de comprimés, un tel comprimé peut comprendre : un liant, tel que de la gomme adragante, de l'amidon de maïs, de la gélatine ; un excipient, tel que du phosphate dicalcique ; un agent de désagrégation, tel que de l'amidon de maïs, de l'acide alginique, etc ; un lubrifiant, tel que stéarate de magnésium ; et un agent édulcorant et/ou aromatisant, comme le sucrose, le lactose, de l'essence de wintergreen, etc. Des véhicules liquides appropriés pour une administration intraveineuse sont une solution saline isotonique, des solutions de tampons phosphates, etc.

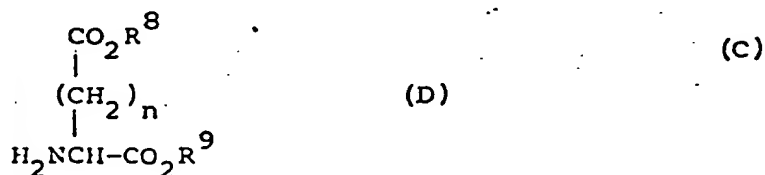
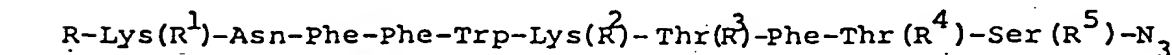
Schéma de réactions



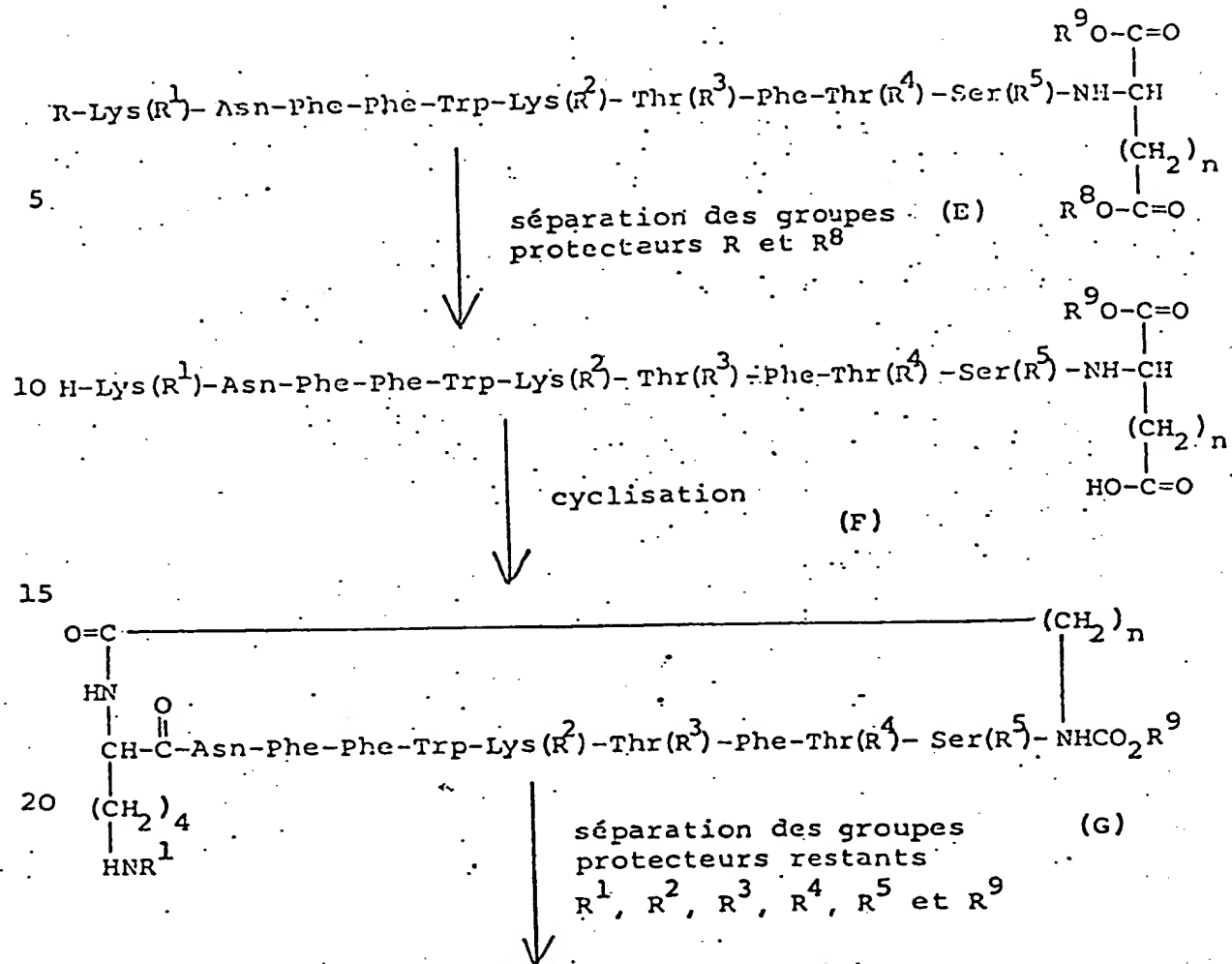
↓ hydrazine/solvant (A)



↓ réactif donnant de l'acide nitreux in situ (B)



35



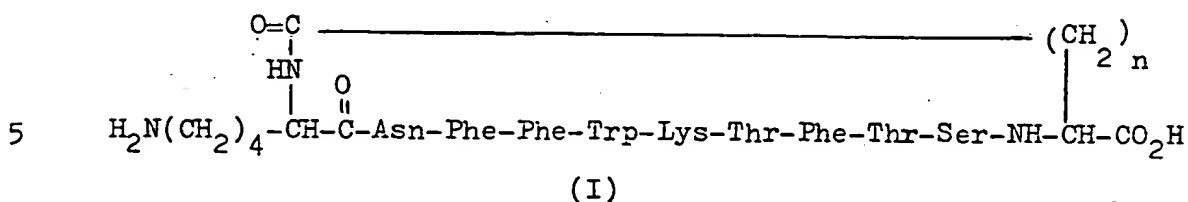
Formule I

25 Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée aux modes de réalisation décrits et représentés qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier, elle comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits, ainsi que leurs combinaisons, si celles-ci sont exécutées suivant

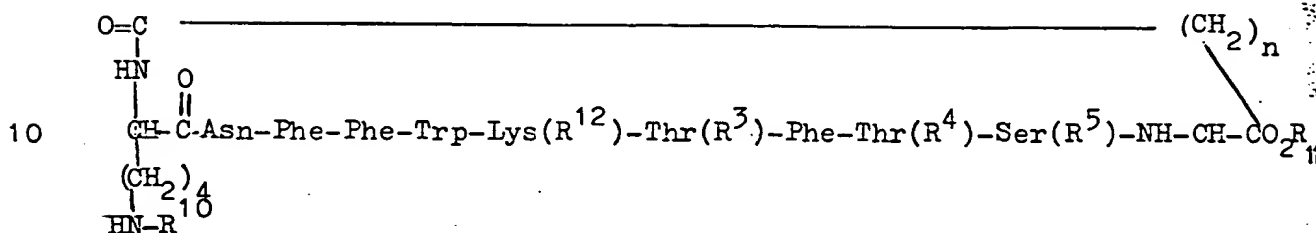
30 son esprit et mises en oeuvre dans le cadre des revendications qui suivent.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Composés nouveaux caractérisés en ce qu'ils appartiennent à la classe comprenant les composés :



et



et leurs sels d'addition d'acide non toxiques, formule dans lesquelles Trp représente le D-tryptophyle ou le L-tryptophyle et tous les autres aminoacides sont de la configuration L ;

R^{12} représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur pour le substituant amino de chaîne latérale, choisi parmi le benzyloxycarbonyle, le tosyle, le t-amyloxycarbonyle, le t-butyloxycarbonyle, le diisopropylméthoxycarbonyle et les benzyloxycarbonyles substitués, dans lesquels le substituant est constitué par un radical halo ou nitro ;

R^3 , R^4 et R^5 représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur pour le groupe hydroxyle alcoolique de la thréonine et de la sérine, ce groupe étant choisi parmi l'acétyle, le benzoyle, le butyle tertiaire, le trityle, le benzyle, le dichloro-2,6 benzyle et le benzyloxycarbonyle ;

R^{10} représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur pour la fonction amino, choisi parmi les groupes définis par R^{12} ;

R^{11} représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur α -carboxyle choisi parmi les alcoyles C_1-C_6 , le benzyle, les benzyles substitués, le phénacyle, le phthalimidométhyle, le benzhydryle, le trichloroéthyle, le 4-picolyle, le β -méthylthioéthyle, le 4-(méthylthio)phényle, le substituant sur le noyau de benzyle étant choisi
5 parmi les radicaux nitro, méthyle et méthoxy ; et

n est un nombre entier de 1 à 5, et au moins l'un des R^3 , R^4 , R^5 , R^{10} , R^{11} et R^{12} étant différent de l'hydrogène.

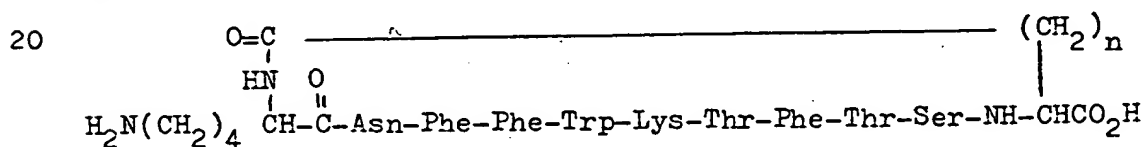
2. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que
10 n est égal à 2.

3. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que Trp est D-tryptophyle.

4. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que Trp est L-tryptophyle.

15 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^{12} et R^{10} sont du 2-chlorobenzoyloxycarbonyle, R^3 , R^4 et R^5 sont du benzyle et R^{11} du benzyle.

6. Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des composés répondant à la formule :

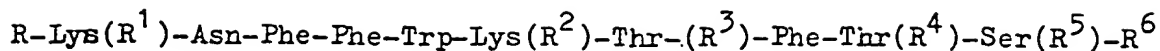


et par leurs sels non toxiques, formule dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 5, et tous les aminoacides chiraux d'un tel composé sont de la configuration L, sauf pour le Trp qui est de la
25 configuration D ou L.

7. Composés suivant la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par un L-lysyl-L-asparaginyll-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-L-phénylalanyl-L-thréonyl-L-séryl-L-glutamyl (cyclo-D-lysyl à γ -glutamyl)peptide ou un
30 sel non toxique de celui-ci.

8. Composés suivant la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par un L-lysyl-L-asparaginyll-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-L-phénylalanyl-L-thréonyl-L-séryl-L-glutamyl (cyclo-D-lysyl à γ -glutamyl)peptide ou
35 par un sel non toxique de celui-ci.

9. Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule :



(II)

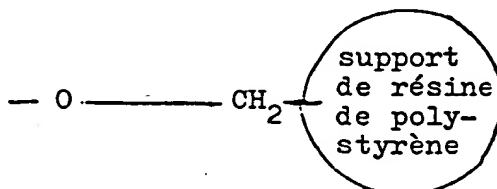
dans laquelle Trp représente le D-tryptophyle ou le L-tryptophyle, et tous les autres aminoacides chiraux sont de la configuration L ;

5 R désigne un groupe protecteur α -amino qui est séparable sous des conditions qui ne sépareront pas les groupes protecteurs R^1 et R^2 ;

R^1 et R^2 désignent un groupe protecteur pour le substituant amino de chaîne latérale de la lysine, ce groupe/protecteur étant
10 choisi parmi le benzyloxycarbonyle, le tosyle, le t-amylloxycarbonyle, le t-butyloxycarbonyle, le diisopropylméthoxycarbonyle et les benzyloxycarbonyles substitués, le substituant étant choisi parmi les radicaux halo et nitro, et R^1 et R^2 étant différents dudit groupe R ;

15 R^3 , R^4 et R^5 représentent de l'hydrogène ou un groupe protecteur pour le groupe hydroxyle alcoolique de la thréonine et de la sérine, ce groupe protecteur étant choisi parmi l'acétyle, le benzoyle, le butyle tertiaire, le trityle, le benzyle, le dichloro-2,6 benzyle et le benzyloxycarbonyle ; et

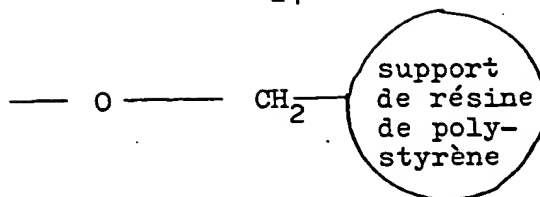
20 R^6 est choisi parmi OH, NHNH_2 , N_3 , OCH_3 et



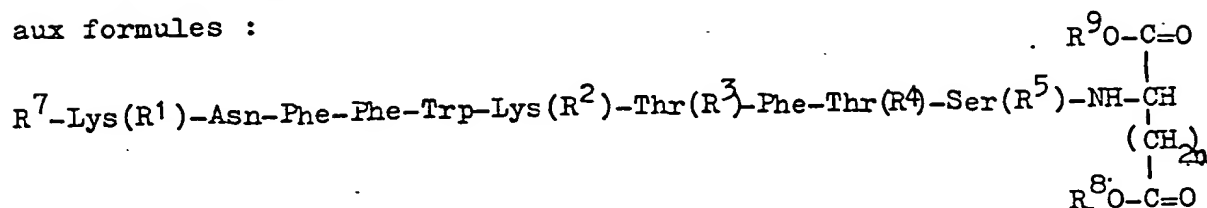
10. Composé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que R est un tert-butyloxycarbonyle, R^1 et R^2 sont du 2-chlorobenzyloxycarbonyle et R^3 , R^4 et R^5 sont du benzyle.

11. Composé suivant la revendication 10, caractérisé en ce que
25 R^6 représente NHNH_2 .

12. Composé suivant la revendication 10, caractérisé en ce que R^6 est



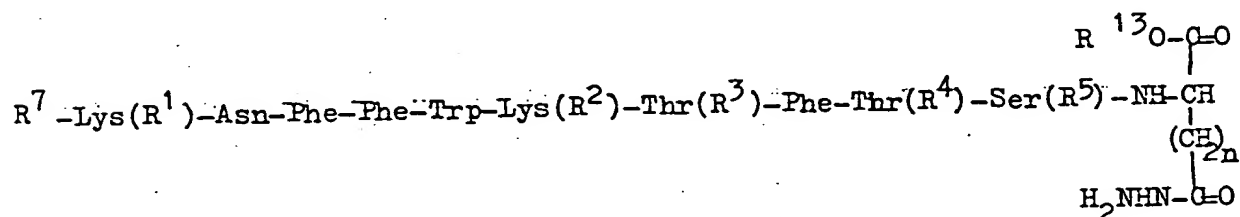
13. Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils répondent aux formules :



5

(A)

et



10

(B)

15 formules dans lesquelles Trp représente le D-tryptophyle ou le L-tryptophyle, et tous les autres aminoacides chiraux sont de la configuration L ;

20 R^1 et R^2 désignent un groupe protecteur pour le substituant amino de chaîne latérale de la lysine, ce groupe protecteur étant choisi parmi le benzyloxycarbonyle, le tosylo, le t-amyloxicarbonyle, le t-butyloxycarbonyle, le diisopropylméthoxycarbonyle et les benzyloxycarbonyles substitués, le substituant étant choisi parmi les radicaux halo et nitro ;

25 R^3 , R^4 et R^5 représentent de l'hydrogène ou un groupe protecteur pour le groupe hydroxyle alcoolique de la thréonine et de la sérine, ce groupe protecteur étant choisi parmi l'acétyle, le benzoyle, le butyle tertiaire, le trityle, le benzyle, le dichloro-2,6 benzyle et le benzyloxycarbonyle ;

R^7 représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur α -amino,

ce groupe protecteur α -amino étant différent des groupes protecteurs R^1 et R^2 , ce groupe protecteur α -amino étant séparable sous des conditions qui ne sépareront pas les groupes protecteurs R^1 et R^2 ;

R^8 représente de l'hydrogène ou un groupe protecteur carboxyle de chaîne latérale, qui est séparable sous des conditions qui ne sépareront pas le groupe protecteur carboxyle R^9 ;

R^9 est un groupe protecteur α -carboxyle qui est stable sous les conditions de réaction qui provoquent la séparation des groupes protecteurs R^7 et R^8 , ce groupe protecteur α -carboxyle étant choisi parmi les alcoyles C_1-C_6 , le benzyle, le phénacyle, le phtalimido-méthyle, le benzhydryle, le trichloroéthyle, le 4-picolyle, le β -méthylthioéthyle, le 4-(méthylthio)phényle et les benzyles substitués, le substituant étant choisi parmi les radicaux nitro, méthoxy et méthyle;

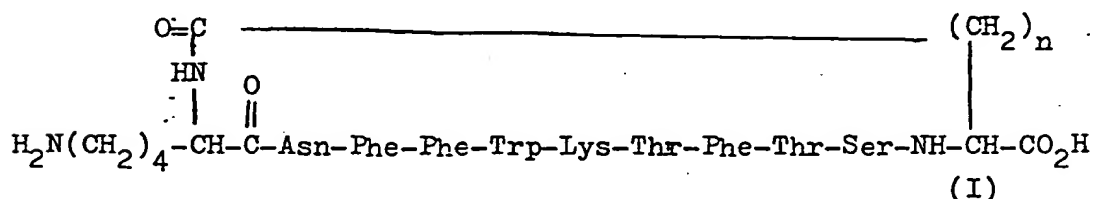
R^{13} désigne de l'hydrogène ou un groupe protecteur choisi parmi ceux qui ont été définis pour R^9 ; et

n est un nombre entier de 1 à 5.

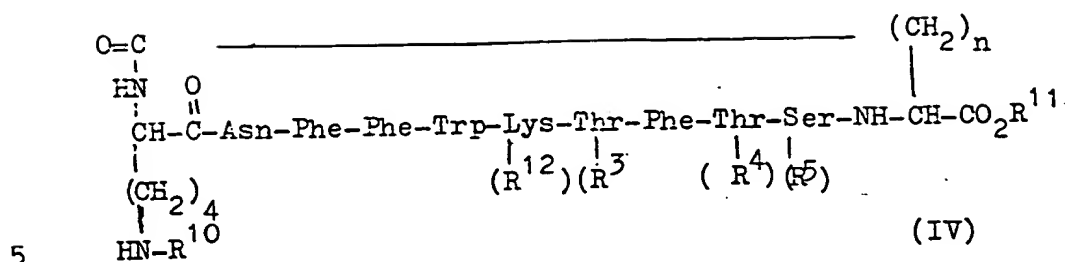
14. Composé suivant la revendication 13, caractérisé en ce qu'il correspond à la formule (A) dans laquelle R^1 et R^2 désignent du 2-chlorobenzoyloxycarbonyl, R^3 , R^4 et R^5 sont du benzyle, R^7 est du t-butyloxycarbonyl, R^8 est du t-butyle et R^9 est du benzyle.

15. Composé suivant la revendication 13, caractérisé en ce qu'il correspond à la formule (A), dans laquelle R^1 et R^2 désignent du 2-chlorobenzoyloxycarbonyl, R^3 , R^4 et R^5 désignent du benzyle, R^7 désigne de l'hydrogène, R^8 désigne également de l'hydrogène et R^9 est du benzyle.

16. Procédé de préparation d'un composé répondant à la formule :



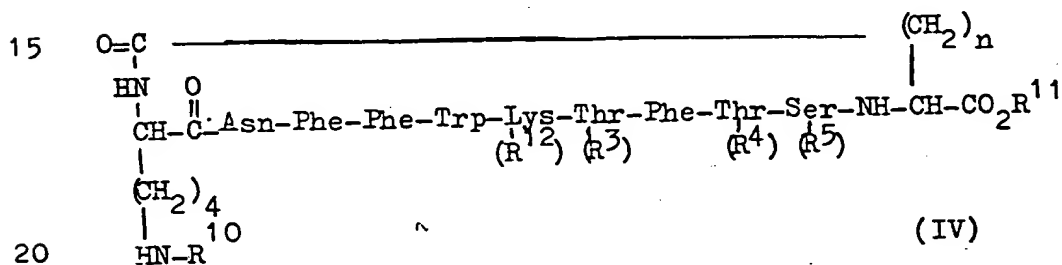
dans laquelle Trp représente du D-tryptophyle ou du L-tryptophyle et tous les autres aminoacides sont de la configuration L, caractérisé en ce qu'il comprend l'enlèvement du ou des groupes protecteurs d'un composé correspondant de la formule :



dans laquelle n, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹⁰, R¹¹ et R¹² ont la signification donnée dans la revendication 1, et, si on le désire, la conversion du composé de formule I ainsi obtenu en un sel d'addition d'acide non

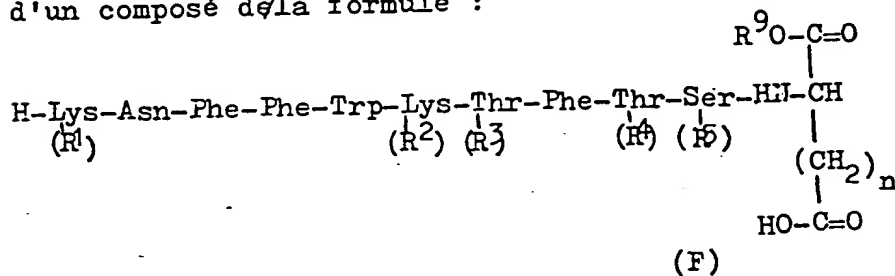
10 17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est effectué en utilisant une hydrogénolyse ou du fluorure d'hydrogène/anisole.

18 Procédé de préparation d'un composé répondant à la formule :

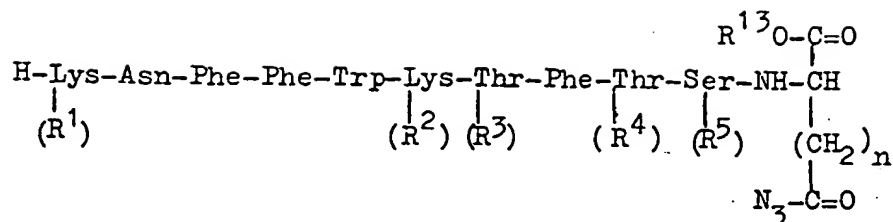


dans laquelle Trp représente du D-tryptophyle ou du L-tryptophyle et tous les autres aminoacides sont de la configuration L, tandis que n, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹⁰, R¹¹ et R¹² ont la définition donnée dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la cyclisation (i)

25 d'un composé de la formule :



en présence d'un agent de cyclisation, ou bien (ii) d'un composé de la formule :



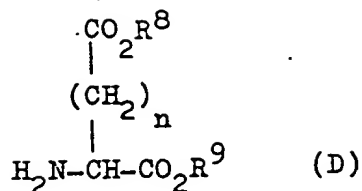
19. Procédé de préparation d'un composé de la formule IV suivant la revendication 18, caractérisé en ce que l'agent de cyclisation est du n,N¹-dicyclohexylcarbodiimide ou du N-hydroxybenzotriazole.

21. Procédé suivant la revendication 18, caractérisé en ce que le composé de formule (F) est préparé par (i) combinaison d'un composé de la formule :

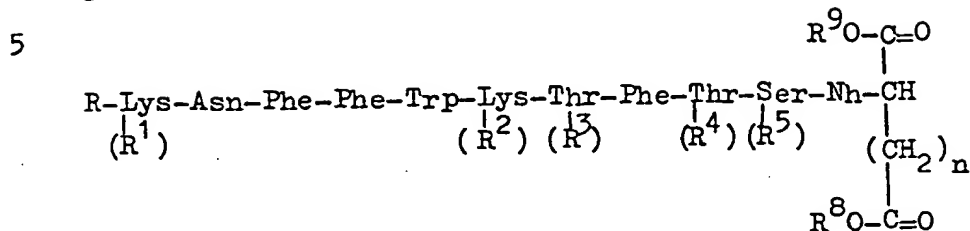
- 25
$$\begin{array}{ccccccccccc} \text{R-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser} & (\text{R}^5)\text{OH} \\ | & & & & & | & | & & | \\ (\text{R}^1) & & & & & (\text{R}^2) & (\text{R}^3) & & (\text{R}^4) \end{array}$$

(IIa)

ou d'un dérivé fonctionnel acylant de celui-ci, avec un composé de la formule :



pour obtenir un composé de la formule :



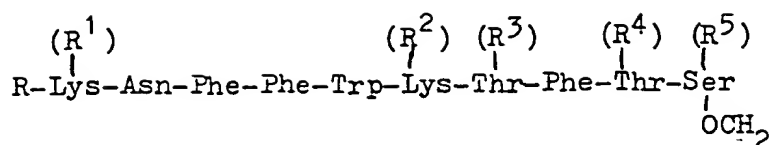
III(a)

- 10 formules dans lesquelles R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^9 ont la définition donnée dans la revendication 18, R représente un groupe protecteur α -amino qui est séparable sous des conditions qui ne sépareront pas les groupes protecteurs R^1 et R^2 , R^8 est un groupe protecteur carboxyle de chaîne latérale, qui est séparable sous des conditions
15 qui ne sépareront pas le groupe protecteur R^9 , et (ii) séparation sélective des groupes protecteurs R et R^8 .

22. Procédé suivant la revendication 21, caractérisé en ce que le dérivé fonctionnel du composé de formule (IIa) est l'azide.

23. Procédé suivant la revendication 22, caractérisé en ce que
la combinaison est effectuée à une température comprise entre
-25°C et 40°C.

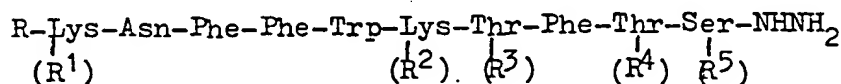
24. Procédé suivant la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que le dérivé azide du composé de formule (IIa) est préparé par (i) réaction d'un composé correspondant ayant pour formule :



II (b)

résine
de support
de polystyrène

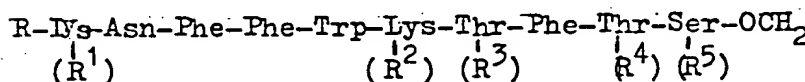
5 avec de l'hydrazine pour donner un composé correspondant de formule:



II(c)

et (ii) réaction de l'hydrazide de formule II(c) avec l'acide nitreux.

10 25. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le composé de formule II (a) est préparé (i) en séparant un composé correspondant de formule :

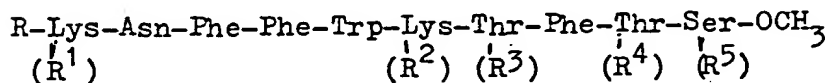


support
de résine de
polystyrène

II(b)

15

par méthanolyse pour donner un composé de formule



II(d)

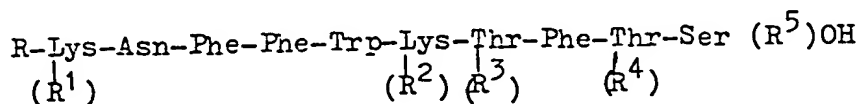
20 et (ii) en hydrolisant le composé de formule II(d).

26. Procédé selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce que le composé de formule II (b) est préparé en combinant séquentiellement les aminoacides protégés et activés, Ser, Thr, Phe, Thr, Lys, Trp, Phe, Phe, Asn, Lys dans des conditions de synthèse en phase solide à un support de résine chlorométhyle ou hydroxyméthylée.

27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 26, caractérisé en ce que Trp est D-tryptophyle.

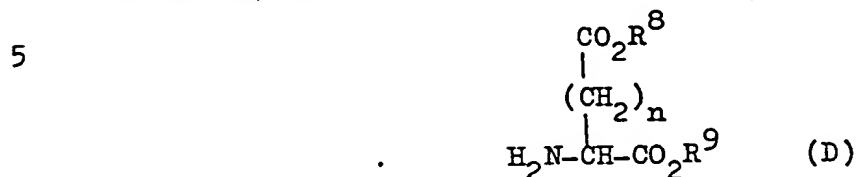
28. Procédé de préparation d'un composé de formule III selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il consiste à combiner un composé de formule :

30

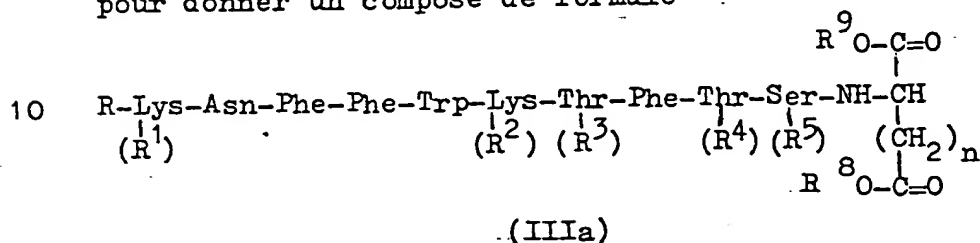


II (a)

ou son dérivé fonctionnel acyclant avec un composé de formule :



pour donner un composé de formule



15 dans laquelle $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$ et R^9 sont tels que définis dans la revendication 13, R représentant un groupe protecteur α -amino qui est séparable dans des conditions ne séparant pas les groupes protecteurs R^1 et R^2 , R^8 est un groupe protecteur carboxyle de chaîne latérale qui est séparable dans des conditions n'enlevant pas R^9 , et si on le souhaite en enlevant sélectivement l'un ou les deux

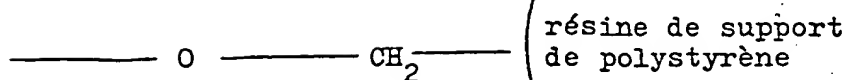
20 groupes protecteurs R et R^8 .

29. Procédé suivant la revendication 28, caractérisé en ce que le dérivé fonctionnel du composé de formule (IIa) est l'azide.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que la combinaison est effectuée à une température comprise entre -25°C et $+10^\circ\text{C}$.

31. Procédé de préparation d'un composé de formule II selon la revendication 9 où R^6 est N_3 , caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé correspondant de formule II où R^6 est $-\text{NHNH}_2$ avec de l'acide nitreux.

32. Procédé de préparation d'un composé de formule II selon la revendication 9 où R^6 est $-\text{NHNH}_2$ caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé correspondant de formule II où R^6 est



avec de l'hydrazine.

5 33. Procédé de préparation d'un composé de formule II selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il consiste à combiner par étape, les aminoacides protégés et activés Ser, Thr, Phe, Thr, Lys, Trp, Phe, Phe, Asn et Lys dans des conditions de synthèse en phase solide, à un support de résine chlorométhylée ou hydroxyméthylée.

10 34. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un composé selon la formule I ou un sel d'acide non toxique de celui-ci selon la revendication 1, avec un véhicule acceptable du point de vue pharmaceutique.

15 35. Composition pharmaceutique selon la revendication 34, caractérisée en ce que Trp dans le composé de formule I est L-tryptophyle.

36. Composition pharmaceutique selon la revendication 34, caractérisée en ce que Trp dans le composé de formule I, est D-tryptophyle.